

研究简报

鱼类细胞电融合的初步研究

刘沛霖、易泳兰、刘汉勤、陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

PRELIMINARY STUDY ON ELECTRIC FUSION OF FISH CELLS

Liu Peilin, Yi Yonglan, Liu Hanqin and Chen Hongxi

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

关键词 大鱗副泥鰌, 鱼类胚胎细胞, 电融合

Key words *Paramisgurnus dabryanus*, fish embryonic cell, electric fusion

电融合是一种细胞生物学新技术, 它的融合率高、操作简便、无毒性、可在显微镜下直接观察融合过程, 是细胞杂交与基因转移的有效手段之一。近几年来, 这一技术已广泛用于动物、植物、微生物细胞和原生质体的融合^[1-4]。但是, 至今未见有电场诱导鱼类细胞融合的研究报道。我们采用国产元、器件, 研制出一套供试验用的电融合装置, 研究了电场诱导鱼类细胞的融合效应。

材料与方法

1. 细胞来源: 用鲤脑垂体按常规方法对大鱗副泥鰌 (*Paramisgurnus dabryanus*) 进行人工催产, 受精卵置于 24—26℃ 培养箱中, 发育至囊胚期备用。

2. 电路方框原理与技术参数: 根据 U. Zimmermann 的原理, 正弦交变电场作介质电泳, 待细胞紧密接触排列成串 (图 1), 然后用脉冲电场作可逆击穿, 导致细胞的融合。我们自行设计装配了一台供实验用的电融合装置 (图 2)。

技术参数: 正弦交变电场频率 0.4—0.6 兆

赫电强 35—50V/cm; 脉冲电场时间常数 25—50 μs, 强度 400—500V。以上诸物理参数可根据实验的效果进行调整。

3. 电融合槽: 用有机玻璃板制成 30×5×1.5mm 长方形小槽。电极用直径为 0.5mm、长 30mm 铂金丝平行嵌入融合小槽两侧。将融合槽直接置于解剖镜载物台上, 观察细胞融合的过程。

4. 电场液: 以 1mol/L 甘露醇 (化学纯) 和 1—5mmol/L 氯化钙 (化学纯) 配制而成。

5. 融合指数 (FI) 公式:

$$FI = \left(\frac{\text{实验组 多核细胞中核的数目}}{\text{计数细胞中核的数目}} - \frac{\text{对照组 多核细胞中核的数目}}{\text{计数细胞中核的数目}} \right) \times 100\%$$

6. 操作程序: 取数十个囊胚期胚胎, 在赫氏液内用镊子切下囊胚。将切下的囊胚分别吸入盛有含 EDTA 的缺钙赫氏液刻度离心管中。A 管作对照组, B 管为实验组。然后用吸管轻轻吹打,

1987 年 11 月 2 日收到。

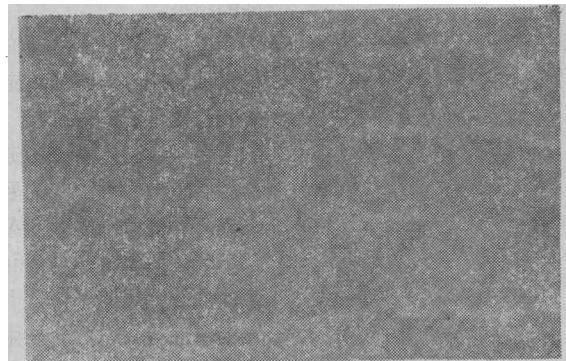


图1 细胞排列成“串珠”

Fig. 1 Cells arranged in "bead chain"

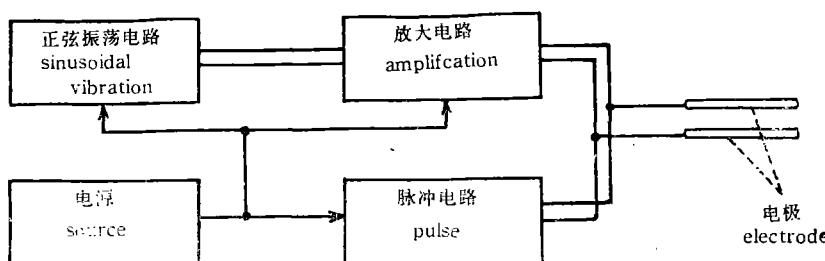


图2 电路方框原理

Fig. 2 Block diagram of the circuit

使囊胚细胞团块充分分散成单个细胞，摇匀。在A管随机取细胞悬液2滴，加1滴0.5%曲利本蓝，染色1分钟后在显微镜下鉴别细胞的存活率。每片计数700—1000个细胞，着蓝色的为死细胞，白色透明的为活细胞。计算融合前细胞的存活率。A管中其余的细胞用3:1甲醇-冰醋酸固定。数分钟后离心，滴片，Giemsa染色，镜检计数融合前细胞中细胞核的个数。又从B管取0.2ml的细胞悬液，计数融合前细胞的密度。其余的全部细胞，以300rpm速度离心3分钟，弃上清液后，加入电场液洗涤一次，再离心弃上清液后，加入少量电场液充分将细胞混和均匀，迅速移入电融合小槽中。待电融合处理后，及时将融合处理后的细胞移入赫氏液，用吸管轻轻吹打，使细胞分散均匀。采用对照组A管的相同方法，分别鉴定融合后细胞的存活率和细胞核的数目，并计算融合指数。

结果与讨论

有关电场液配方、温度、细胞密度和蛋白酶等

诸因素对鱼类胚胎细胞电融合效应的研究结果，拟另文报道。本文的初步结果是在9—15℃室温下，电场液用0.02mol/L甘露醇加1mmol/L氯化钙配成。细胞密度为 $2.5-3 \times 10^4$ ，细胞膜紧密接触2—5分钟，脉冲处理1—3次，时间常数10—50μs的条件下取得(表1)。

表1 电场诱导鱼类囊胚细胞融合的效应

Tab. 1 Effects of fish blastula cell fusion induced by electric field.

	双核细胞 Dikaryocyte	多核细胞 Multikaryocyte	融合率(%) FI	存活率(%) Viability
$\bar{x} \pm S^*$	283 ± 174	506 ± 321	46.7 ± 10.8	88.6 ± 4.4

*由11次实验结果计算所得。

* Calculated from eleven experimental results.

从表1可以看出，在给定的实验条件下，大鱗副泥鰌囊胚细胞的融合率约为46.72%。经脉冲处理后一部分生成双核细胞，大部分为多核细胞。

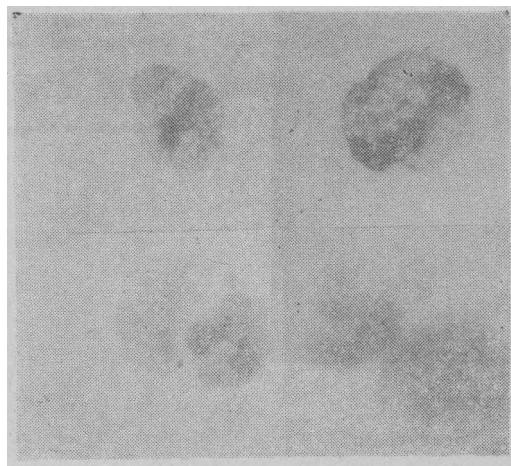


图3 双核、三核、四核及多核细胞

Fig. 3 Dikaryocyte, trikaryocyte, tetrakaryocyte and multikaryocyte

(图3),但细胞的存活率仍保持较高的百分比,约88.6%。当融合率较高时,部分融合细胞外观有些变形。而在融合处理之前,双核细胞中核的数目约占计数细胞中核的数目的7—20%,一般在10%以下,细胞的存活率为97—98%。可以看出,经脉冲处理后,大多数细胞融合成为双核或多核细胞,而对细胞的存活率无明显的影响。因此,可以初步得出如下结论:(1)我们自行设计的电融合装置基本适用于鱼类细胞融合的实验要求;(2)大鳞副泥鳅的囊胚细胞在含0.02mol/L甘露醇和1mmol/L氯化钙的电场液,细胞密度2.5— 3×10^4 ,细胞膜紧密接触2—5分钟,脉冲处理1—3次,时间常数10—50μs条件下可以得到较

好的结果。

鱼类细胞融合的研究至今尚未多见,童第周曾以仙台病毒为媒介,定性地证明了金鱼囊胚细胞间及金鱼囊胚细胞与Ehrlich腹水肿瘤细胞间的融合^[5]。国外曾有报道分离的鱼胚胎细胞重新接触后又出现细胞间的融合。阎康等用PEG促进鲫的异倍体细胞系CAB-80的细胞融合^[6],融合指数在30%左右,而细胞的存活率则随PFG浓度的加大显著下降。因此,就融合指数与细胞存活率而论,电融合技术明显地具有效率高和无毒性的优点,而且操作也较为简便。当然本文的初步试验结果,同前人在动物、植物和微生物细胞电融合的结果相比,融合指数还不够理想,有待今后继续解决。作者认为:随着电融合技术的进一步完善与提高,它有可能成为细胞工程与基因工程的一种较为有效的手段,将为鱼类细胞遗传学与体细胞育种的研究开辟新的途径。

参 考 文 献

- [1] 汪和睦等,1986。电场诱导营养缺陷型酵母原生质体的融合。生物工程学报,2(3): 44—50。
- [2] 钱进,1985。细胞工程的又一重大进展——电融合技术。生物科学动态,(3): 7—15。
- [3] 汪和睦,鲁玉瓦,1985。电场诱导细胞融合。生物化学与生物物理进展(3): 52—58。
- [4] 喻致祥,1985。细胞融合的控制与应用。生物科学动态,(3): 16—20。
- [5] 童第周,1973。融合细胞。动物学报,19(1): 76。
- [6] 阎康等,1984。鱼类细胞融合的初步研究。遗传,6(6): 19—21。